

Parásitología molecular

LEISHMANIASIS

Modulación de la expresión de quimiocinas y patrones de fosforilación en leucocitos humanos durante la infección con *Leishmania panamensis*

Adriana Navas¹, Marina Freudzon², Robert Balderas³, María Adelaida Gómez¹

¹ Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali, Colombia

² Department of Medicine, Yale University, New Haven, CN, USA

³ BD Biosciences

Introducción. Los eventos iniciales en la infección por *Leishmania* spp. contribuyen al desenlace clínico. Los estudios de la infección en el modelo de ratón muestran que el parásito modula la expresión de quimiocinas y las vías de señalización de las células que las producen.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la infección por *Leishmania panamensis* modula la expresión de quimiocinas y patrones de señalización en leucocitos humanos.

Materiales y métodos. Se infectaron leucocitos totales de sangre periférica de donantes sanos (n=3) y pacientes con leishmaniasis (n=3) *in vitro* por 2 y 24 horas con *L. panamensis*.

Se examinó la expresión de quimiocinas por PCR-arrays y se confirmó por qRT-PCR. El nivel de fosforilación de ERK1/2, STAT-1 y STAT-5 en respuesta a la infección y estimulación con PMA, IFN γ e IL-2, respectivamente, se evaluó por citometría de flujo. El análisis de datos se hizo utilizando Cytobank y Graph Pad-5.0.

Resultados. Los niveles de expresión de CSF3, CXCL2, CCL3 e IL1A en leucocitos de pacientes con leishmaniasis, fueron en promedio 21, 2,4, 6,5, y 43,5 veces más altos que en donantes sanos, en respuesta a la infección *in vitro*. En contraste, MMP7 se expresó 22,1 veces más en leucocitos de individuos sanos en respuesta a la infección.

La preexposición de los leucocitos de pacientes a *Leishmania* spp., induce un estado de activación persistente de linfocitos T e inactivación de la señalización vía STAT-1 en monocitos. Esto se demuestra por una mayor fosforilación de ERK 1/2 y STAT-5 en respuesta a PMA e IL-2, y menor fosforilación de STAT-1 en respuesta a IFN γ , en

comparación con leucocitos de donantes sanos.

Conclusiones. Las alteraciones en el estado de pre-activación celular o “memoria de señalización” podrían estar asociadas a la expresión diferencial de quimiocinas, migración celular, inflamación y desenlace clínico de la leishmaniasis.

Financiación. Colciencias código 222949326161, Down's Fellowship y BD-Biosciences.

• • •

Análisis bioinformático de genes candidatos a vacuna contra la leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania (Viannia) panamensis*

Angélica Bonilla-Iriarte¹, José Robinson Ramírez², Juan Fernando Alzate³, Omar Triana-Chávez¹

¹ Grupo BCEI, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Grupo de Inmunomodulación, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Centro Nacional de Secuenciación Genómica, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La secuenciación del genoma completo de algunas especies de *Leishmania* permite la búsqueda por medio de herramientas bioinformáticas de epítomos que puedan postularse como posibles blancos de vacuna. Sin embargo, en la actualidad especies de alto interés en Colombia, como *Leishmania (Viannia) panamensis*, no cuentan aún con la secuenciación de su genoma. Por lo tanto, se hace necesario generar estrategias de búsqueda que permitan, a partir de otros genomas, generar moléculas candidatas para la prevención de la enfermedad.

El objetivo del estudio fue identificar en *Leishmania braziliensis* secuencias genómicas ortólogas a *L. major*, con antecedentes antigénicos, con el fin de amplificar estos genes en *L. (Viannia) panamensis*.

Materiales y métodos. Se buscaron los ortólogos de secuencias reportadas para *L. major* como antigénicas, por BLAST en *L. braziliensis*. Con base en estas secuencias se diseñaron cebadores para amplificar por PCR convencional las secuencias de interés en *L. (Viannia) panamensis*. Los amplicones se clonaron utilizando el sistema Instaclone y,

posteriormente, se secuenciaron, analizaron e identificaron usando diferentes herramientas bioinformáticas como BioEdit, ClustalX y BLASTN.

Resultados. Se obtuvieron seis secuencias muy antigénicas en *L. major* que presentaron ortólogos en *L. braziliensis* y las cuales amplificaron en *L. (Viannia) panamensis*. La secuenciación de los amplificadores y posteriores alineamientos, reportó alta conservación entre los tamaños esperados, pero se presentaron transiciones de algunos nucleótidos entre las secuencias de las especies del viejo y nuevo mundo. Una secuencia sin ortólogo en *L. braziliensis* amplificó en *L. (Viannia) panamensis*, pero el tamaño esperado para ésta cambió.

Conclusiones. La información genómica que se tiene en la actualidad para el género *Leishmania* es útil para la búsqueda de moléculas ortólogas de diferentes especies del parásito que no tienen su genoma completamente secuenciado. En este trabajo se identificaron siete genes en *L. (Viannia) panamensis*, en los cuales se ha demostrado su gran capacidad antigénica.

• • •

Modulation of cell cycle and protein expression in *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes by depletion of iron

Camila Mesquita-Rodrigues^{1,3}, José B. de Jesus^{2,3}, Rubem Menna-Barreto⁴, Elen M. de Souza⁴, Mariana Waghbi⁵, Patrícia Cuervo³

¹ Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

² Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Federal de São João Del Rei, Minas Gerais, Brasil

³ Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

⁴ Laboratório de Biologia Celular, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

⁵ Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Introduction. Iron is an essential element for *in vitro* and *in vivo* survival of microorganisms, acting as a cofactor of several enzymes and playing a critical role in host-parasite relationship. Only the more virulent strains, endowed with effective mechanisms to acquire iron from healthy hosts can invade, colonize, multiply and establish infection. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is a parasite widespread in the new world and considered to be the major etiological agent of American tegumentary

leishmaniasis. Despite this fact, the role of iron on the growth and virulence of this species is still unclear.

Material and methods. Promastigotes from cultures which had reached the logarithmic phase of growth were inoculated into iron-supplemented and iron-depleted medium. Iron depletion was carried out by the addition of 2,2-dipyridyl ranging from 25 μ M to 180 μ M. Cytotoxicity of 2,2-dipyridyl was measured using alamar blue dye fluorometric method. IC₅₀ values were calculated after 24 and 48 hours of incubation. Ultrastructural analysis was made after treatment with 100 μ M of iron chelator. Fluorescence-activated cell sorting analysis of tetramethylrhodamine, TUNEL, 7AAD and PI labeled parasites was made to complement ultrastructural analysis of treated cells. Whole extracts of promastigotes obtained from parasites growth in iron-rich and iron-depleted medium were submitted to fractionation by two-dimensional electrophoresis.

Results. It was observed that parasite growth curve is affected by the concentration of 2,2-dipyridyl and it depends on the time of culture in depleted medium. In cytotoxicity assays, the ratio between fluorescence intensity and concentration of iron chelator was also dose dependent. Concentrations of 100, 140 and 180 μ M of 2,2-dipyridyl significantly affected the fluorescence emitted by both isolates after 24 and 48 hours of incubation. Ultrastructural analysis of treated promastigotes revealed a remarkable mitochondrial swelling with loss of cristae and matrix and presence of concentric membrana structures inside the organelle. Iron depletion also induced Golgi disruption and intense cytoplasmic vacuolization. Fluorescence-activated cell sorting analysis of tetramethylrhodamine stained parasites showed that 100 μ M of 2,2-dipyridyl collapsed the mitochondrial membrane potential. TUNEL and 7AAD labeling for DNA fragments were negative. Preliminary data suggest that there are several proteins involved in proteolysis and signaling suffering up- or down-regulation by iron.

Conclusions. Iron is essential for multiplication and survival of *L. (V.) braziliensis in vitro*. The results show that iron depletion affects ultrastructure and protein expression of the parasite and suggest that induction of cell death does not occur by classical apoptosis.

• • •

Clonación, expresión y obtención de anticuerpos contra la α -tubulina de *Leishmania braziliensis*

Cesar Ramírez¹, José María Requena², Concepción J. Puerta¹

¹ Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

² Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

Introducción. Las α -tubulinas son proteínas fundamentales en la conformación del citoesqueleto. Se han empleado en cinetoplastidos como control para estudios de la regulación genética y para identificar nuevas moléculas con actividad antimitótica selectiva.

En este trabajo el gen de la α -tubulina LbrM13_V2.0200 fue amplificado, clonado y expresado en *Escherichia coli*, con el fin de obtener la proteína, así como anticuerpos contra la misma tras su inoculación en conejos, para su uso en estudios posteriores.

Materiales y métodos. Para amplificar la región codificante de 1.356 pb del gen de la α -tubulina, se diseñaron los iniciadores Lb-Tub-F (5' GGATCCATGCGTGAG GCTATCTGC 3') y Lb-Tub-R (5' CTGCAGCTAGTACTCCTCGACGTCCT 3'), los cuales contenían las dianas de restricción BamHI y PstI, respectivamente, para dirigir la clonación en el marco correcto de lectura en el vector PCR[®]II. Tras verificación de la secuencia del inserto, se procedió a clonar en el vector de expresión pQE30, seguido de transformación de células M15 de *E. coli*. El antisuero policlonal contra la misma se obtuvo en conejos Nueva Zelanda tras cuatro inoculaciones.

Resultados. Se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 1.350 pb, el cual fue exitosamente clonado en ambos vectores, verificándose la secuencia del inserto en ambos casos. La proteína respectiva, inducida con 2 mM de IPTG, tras purificación por columnas de afinidad, presentó el tamaño molecular esperado de 50,78 kDa, siendo reconocida por los anticuerpos policlonales obtenidos, al igual que la proteína nativa del lisado del parásito (49,68 kDa).

Conclusión. La proteína α -tubulina de *Leishmania braziliensis* purificada en conjunto con los anticuerpos respectivos, constituye una herramienta de utilidad en la tamización *in vitro* de moléculas que interactúen con ésta.

Caracterización funcional de un sistema de expresión génica inducible en la línea celular U937, fase 1

Cristian Camilo Galindo¹, Diana Vanegas¹, Nicolás Lemus^{1,2}, Myriam Salazar¹, Consuelo López², Carlos Arturo Clavijo^{1,2}

¹ Modelamiento y Control de Sistemas Biológicos, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La línea celular U937 se ha usado en el estudio de procesos como la infección de macrófagos por *Leishmania* spp. Dado que la interacción entre el parásito y su célula huésped implica procesos moleculares complejos, el grupo de investigación Modelamiento (sic.) y Control de Sistemas Biológicos ha venido implementando un modelo *in vitro* para el estudio de la infección por *Leishmania infantum* en macrófagos humanos.

El objetivo de este trabajo fue implementar un sistema de expresión génica inducible en la línea U937; esto, como parte inicial en la obtención de un modelo de silenciamiento genético inducible para el estudio de la interacción *Leishmania*-macrófago.

Materiales y métodos. El sistema de expresión génica inducible se basó en el kit de Invitrogen ViraPower[™] HiPerform[™] T-Rex[™] Gateway[®] Expression System. Los vectores lentivirales se produjeron en la línea celular HEK-293FT y la transducción de las células U937 se hizo con un MOI entre 50 y 150. Las células U937 transducidas con los diferentes constructos genéticos se amplificaron y caracterizaron en su cinética de cultivo. Los ensayos de inducción de la expresión consistieron en la incubación de las células control y transducidas con el agente inductor (tetraciclina 0,1 μ g/ml) y el seguimiento en el tiempo de la expresión de la proteína verde fluorescente mediante la adquisición de imágenes de microscopía de fluorescencia. El análisis estadístico consistió en la práctica de ANOVA para la comparación de medias entre parejas de tratamientos.

Resultados. Se hizo la transducción con 100 % de eficiencia la línea U937. Tras la inducción de la expresión se observó un aumento en la fluorescencia cercano al 70 %.

Conclusiones. Se estableció que el sistema de expresión inducible de la proteína verde fluorescente es funcional en esta línea celular, lo que da paso a la implementación de un modelo mejorado para el estudio de la interacción *Leishmania*-macrófago.

Initial analysis of the *Leishmania amazonensis* genome

Diogo Tschoeke^{1,2}, Herbert Guedes³, Rodrigo Jardim^{1,2}, Mariana Côrtes Boité⁴, Gisele Lopes Nunes^{1,2}, Antonio Ribeiro^{1,6}, Elisa Cupolillo⁴, Antonio Basilio Miranda^{1,2}, Jeronimo Ruiz⁵, André Pitaluga⁶, Floriano P. Silva Jr.^{1,7}, Christian Probst⁸, Jeremy Mottram⁹, Alberto M. R. Dávila^{1,2}

¹ Pólo de Biologia Computacional e Sistemas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

² Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, Brasil

³ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

⁴ Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

⁵ Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais, Brasil

⁶ Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores, I Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

⁷ Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

⁸ Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, Brasil

⁹ Glasgow Biomedical Research Centre, University of Glasgow, Scotland, United Kingdom

Introduction. *Leishmania amazonensis*, primary etiologic agent of the diffuse cutaneous form of leishmaniasis, is transmitted mainly by sand-fly *Lutzomyia flaviscutellata*. In some cases it causes the simple cutaneous form, suggesting that molecular aspects of the parasite may also be involved in different clinical outcomes. We aim to produce more information about the genome, allowing researchers to better understand the parasite role in the disease.

Materials and methods. The strain MHOM/BR/1973/M2269, isolated from patients with simple lesions, had its genome sequenced using the Illumina Platform. The sequence assembly was made using Velvet_0.7.55, in an initio mode, without a reference genome, followed by a search for ORFs. Sequences were submitted to the STINGRAY (<http://stingray.biowebdb.org>), including similarity analysis with BLAST against Uniref and ProtozoaDB (<http://protozoadb.biowebdb.org>) databases.

Results. 10,305 contigs (4,827 contigs above the 1,000 bp cutoff) were obtained with 58.8% GC content. The smallest and largest contigs had 1,001 and 141,211 bp respectively, the mean being 5741. Similarity analysis using Blastx and the 4,827 ORFs showed that 18% had no similarity to any sequence in Uniref90_v.2011_06 database (868 sequences)

or the *L. mexicana* genome (851 sequences). Another search looking for conserved domains using RPSBLAST against CDD database, showed that 1198 sequences (25%), had no hits, representing potential *Leishmania* or Trypanosomatid specific domains. The most abundant genes/domains found were: ABC transporter, Kinesin, ATP-dependent RNA helicase, HSPs, Protein kinase, dynein heavy chain, Calpains, Amastin surface glycoprotein. Single-copy genes/domains were: 40S (S10/S12/S2/S5/S8) and 60S (L12/L13/L19/L23/L7) ribosomal proteins.

Conclusions. This is an initial analysis of the *L. amazonensis* genome, and the preliminary results demonstrated that there are about 2,000 sequences uncharacterized based on similarity analysis. Now we are performing additional similarity analyses against InterProScan and characterizing orthologous groups (OrthoSearch and OrthoMCL) to make a more complete annotation of the genome.

Support. CNPq, CAPES, FIOCRUZ.

• • •

Leishmania panamensis modula la expresión del correceptor CD14 en células humanas del linaje monocito/macrófago y actúa como receptor de fagocitosis del parásito.

Gloria Raffo^{1,2}, Adriana Navas², Carolina Gallego²

¹ Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores "Virginia Gutiérrez de Pineda", Colciencias, Bogotá, D.C., Colombia

² Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali, Colombia

Introducción. La CD14 es una glucoproteína de superficie expresada en monocitos y macrófagos. Se han identificado diferentes fenotipos de monocitos con características funcionales distintas en el humano: monocitos clásicos (CD14⁺CD16⁻) que exhiben una respuesta antiinflamatoria y son fagocitos eficientes; monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺), que presentan una respuesta combinada de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias; y monocitos proinflamatorios (CD14^{dim}CD16⁺), que son más potentes para la presentación de antígenos. Se reconoce que la reducción en la expresión de CD14 ocurre en monocitos de individuos expuestos a *Leishmania panamensis*. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los cuales la infección modula la expresión de CD14 en monocitos/macrófagos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la infección sobre el fenotipo de monocitos y

macrófagos, e identificar el papel de CD14 en la respuesta a *Leishmania* spp.

Materiales y métodos. En monocitos y macrófagos humanos aislados de sangre periférica e infectados con *L. panamensis*, se identificaron por FACS, subpoblaciones celulares con base en la expresión de CD14 y CD16. Se analizó la producción de CD14 soluble en sobrenadantes de macrófagos infectados, y se determinó la carga parasitaria y supervivencia de parásitos en macrófagos después del bloqueo de CD14. Se evaluó la sensibilidad a la infección de las subpoblaciones, de acuerdo con la expresión de marcadores celulares. Los análisis estadísticos se hicieron con GraphPad Prim 5.0.

Resultados. Se confirmó la reducción en la expresión de CD14 en respuesta a *L. panamensis* asociada a la reducción significativa de la subpoblación CD14⁺⁺CD16⁺ y al aumento de células CD14⁻CD16⁺. Se identificó la infección preferencial de células CD14^{high} y se asoció la presencia de CD14 con un incremento en la sensibilidad a la infección. La reducción de CD14 en membrana se observó independientemente de la producción de la forma soluble. Finalmente, el bloqueo de CD14 redujo la carga parasitaria y la supervivencia del parásito.

Conclusión. La infección por *L. panamensis* de monocitos y macrófagos reduce la expresión del correceptor CD14, posiblemente como mecanismo de la célula huésped para limitar la infección y la supervivencia del parásito.

Apoyo. Fogarty International Center, US National Institutes of Health, contrato 1 D43 TW006589; Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores, Colciencias, convocatoria 496 de 2009.

• • •

Formulación y caracterización de una vacuna liposómica contra la leishmaniasis cutánea por *Leishmania (Viannia) panamensis* y evaluación de su capacidad inmunógena en ratones

Jelver Sierra^{1,2}, Julián Londoño^{1,2}, Natalia Muñoz¹, Diana Patricia Colorado¹, David Cardona^{1,2}, Tânia Beatriz Creckzynski-Pasa³, José Robinson Ramírez-Pineda¹

¹ Grupo Inmunomodulación, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Laboratório de Interações entre Micro e Macromoléculas, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Introducción. El desarrollo de vacunas es el mejor método de prevención de las enfermedades infecciosas. Colombia es un país endémico para leishmaniasis, enfermedad para la cual no existe vacuna efectiva. *Leishmania (Viannia) panamensis* es el parásito más frecuentemente reportado como agente causal de leishmaniasis en el país.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un modelo de vacuna liposómica para la leishmaniasis por *L. (Viannia) panamensis* y evaluar su capacidad inmunógena en ratones.

Materiales y métodos. Se formularon liposomas catiónicos cargados de antígeno soluble de *Leishmania (Viannia) panamensis* y un adyuvante (oligonucleótidos sintéticos con motivos CpG, ODN-CpG) por el método de hidratación de película. Se hizo una caracterización fisicoquímica de dichas formulaciones en términos de la cantidad de antígeno y adyuvante encapsulado, del tamaño y potencial z de las partículas, de la morfología liposómica y de la interacción del material encapsulado con la bicapa lipídica. La capacidad inmunógena se evaluó por medio de la producción de anticuerpos específicos en el suero.

Resultados. Las partículas obtenidas tenían un tamaño de 878,6 nm, un potencial z de 61,5 mV y contenían 250 µg/ml de antígenos y 112 µg/ml de adyuvante. Los ensayos preliminares por microscopía de fuerza atómica, sugieren una interacción directa del ODN- CpG con la bicapa lipídica y la presencia del antígeno en la fase soluble encapsulada. La vacunación de ratones con la formulación liposómica indujo la producción de anticuerpos específicos de *L. (Viannia) panamensis* de clase IgG1 e IgG2a.

Conclusiones. Se logró producir y caracterizar una vacuna liposómica para la leishmaniasis por *L. (Viannia) panamensis* y confirmar su capacidad inmunógena en ratones. Los experimentos que permitirán determinar la eficacia de esta formulación están siendo ejecutados actualmente.

• • •

Diseño de un sistema reportero de anticuerpos contra la proteína antigénica rK346 de *Leishmania infantum* mediante un bioconjugado rK346-peroxidasa C

Juan Carlos Rengifo, María Tibisay Ruiz, Wilfredo Quiñones, Juan Luis Concepción
Laboratorio de Enzimología de Parásitos, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

Introducción. Los sistemas reporteros proteicos poseen un gran potencial en el diagnóstico de enfermedades parasitarias. Comúnmente, estos sistemas constan de anticuerpo-proteína reportera. En este trabajo se reporta un sistema reportero novedoso que utiliza el antígeno (rK346 de *Leishmania infantum*) acoplado a la peroxidasa C (HRPc) y, el glutaraldehído, como brazo químico con el fin detectar anticuerpos anti-rK346.

Materiales y métodos. La conjugación se hizo en dos pasos, utilizando una relación 1:5 (rK346:HRPc). Inicialmente, se incubaron 0,4 mg de la rK346 por dos horas a 4 °C con glutaraldehído al 1,25 % (concentración final); el exceso del brazo fue eliminado con una columna PD-10. Finalmente, se añadieron 2 mg de la HRPc (RZ=4,37) y se incubó la mezcla durante dos horas a 4 °C. La reacción se detuvo con glicina 0,2 M (concentración final). Los distintos conjugados se separaron mediante una cromatografía de exclusión molecular (Sefarosa S-200) y a las fracciones se les determinó su actividad peroxidasa y se evaluaron en placas de ELISA previamente sensibilizadas con tres microgramos (3 µg) de anticuerpos anti-rK346, purificados a partir de sueros de conejos hiperinmunizados con este antígeno. A fin de evaluar la capacidad de capturar el conjugado rK346 – HRPc, se incubaron las fracciones por una hora a 37 °C, lo que reveló la presencia de conjugado por incubación con una solución de TMB y cuantificación de la intensidad del color con un elisómetro a 450 nm.

Resultados. Se obtuvo una población heterogénea de conjugados rK346 – HRPc demostrados por la elución de fracciones con diferentes pesos moleculares (60 a 200 kDa), con actividad peroxidasa y que son reconocidos por los anticuerpos anti-rK346 reflejado por absorbancias entre 0,6 y 2,0.

Conclusiones. Con esta herramienta se pueden detectar con mayor sensibilidad los anticuerpos presentes en sueros de personas con leishmaniasis visceral, en etapas temprana de la enfermedad.

Evaluación de la utilidad del *espaciador transcrito interno* (ITS1) para la determinación molecular de especie en aislamientos clínicos de *Leishmania* spp.

Lily Martínez, Margaret Paternina-Gómez, Luis E. Paternina, Alveiro Pérez-Doria, Eduar E. Bejarano
Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia

Introducción. La importancia de un diagnóstico temprano y de la identificación de especies de *Leishmania* ha promovido el desarrollo de nuevas herramientas moleculares con distintos grados de sensibilidad y especificidad. En la literatura científica se encuentran registrados diversos genes de copia única y de múltiples copias, que se han usado para el diagnóstico molecular de *Leishmania*.

En el presente trabajo se valoró la utilidad de la secuencia nucleotídica del *espaciador transcrito interno* (ITS1) en la determinación de especies del género *Leishmania*.

Metodología. Se estudiaron 47 muestras clínicas de pacientes con cuadros clínicos indicativos de leishmaniasis, que asistieron a centros de salud de la región de Los Montes de María, Colombia. Se extrajo el ADN total a partir de los parásitos aislados por cultivo y de las muestras clínicas obtenidas directamente de pacientes. Se amplificó la región variable de los minicírculos del cinetoplasto (13A/13B) y la región del ITS1 (L5.8S/LITSR); esta última se secuenció y se analizó para determinar la especie de *Leishmania* causante de la enfermedad.

Resultados. Mediante kDNA-PCR se obtuvo una tasa de éxito de 87,23 %, al detectar *Leishmania* en 41 de las 47 muestras procesadas. Con ITS1-PCR se detectó ADN de los parásitos en 91,49 % de las muestras, que corresponde a 43 de 47 disponibles. El análisis filogenético de las secuencias permitió ubicar estos aislamientos en el complejo *Leishmania braziliensis*, mientras que una muestra obtenida por punción esplénica correspondió a *L. infantum*.

Conclusión. Aunque ITS1-PCR presenta una gran sensibilidad para detectar *Leishmania*, el análisis de las secuencias nucleotídicas revela que este marcador no permite diferenciar las especies del complejo *L. braziliensis*.

• • •

Expresión diferencial de proteínas asociadas con resistencia a miltefosina en *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* mediante análisis proteómico

Lina María Orrego¹, Carlos E. Muskus¹, Patricia Cuervo², Yara María Traub-Cseko³, Marcel Marín¹

¹ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

³ Laboratorio de Biología Molecular de Parasitos e Vetores, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Introducción. La miltefosina es el primer medicamento de administración oral que ha mostrado eficacia en el tratamiento de la leishmaniasis. Actualmente no existen reportes de aislamientos clínicos de *Leishmania* resistentes a miltefosina, pero, la facilidad con la que pueden seleccionarse *in vitro* líneas resistentes y la larga vida media plasmática del medicamento (150 a 200 horas), no permiten excluir la posibilidad de aparición de resistencia a miltefosina en aislamientos de campo.

En el presente trabajo se propuso identificar las proteínas involucradas en mecanismos de resistencia a la miltefosina en la cepa de *Leishmania (Viannia) panamensis* (MHOM/87/CO/UA140).

Materiales. Se hizo un estudio de proteómica comparativa empleando electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, con el fin de identificar proteínas asociadas con resistencia a miltefosina en *L. (V.) panamensis*.

Resultados. Se detectaron, en promedio, 550 proteínas en los geles bidimensionales, de los cuales 11 mostraron ser diferencialmente expresados entre las cepas de *L. (V.) panamensis* sensibles y resistentes a miltefosina. Las proteínas se identificaron como proteínas de choque térmico de 60 y 70 kDa, proteínas ribosómicas (P2, S12), proteínas que participan como enzimas en vías metabólicas (peroxiredoxina, fosfatasa p-nitrofenil) y una proteína hipotética.

Conclusión. La vigilancia de la resistencia a medicamentos basada en la detección de marcadores moleculares, puede convertirse en un sistema de alerta temprana de resistencia en aislamientos clínicos de *Leishmania* spp., que permita tomar medidas tendientes a proteger la miltefosina como medicamento leishmanicida y hacer recomendaciones sobre su adecuado empleo.

• • •

Producción de un anticuerpo monoclonal contra la proteína con actividad COX de *Leishmania mexicana*

Luis Alberto Estrada-Figueroa, Yolanda Medina-Flores, Verônica Ivonne Hernández-Ramírez, Patrícia Talamás-Rohana

Introducción. Los estudios recientes han demostrado que el parásito *Leishmania mexicana* presenta una proteína con actividad COX, lo cual

podría sugerir que esta proteína participa en la evasión de la respuesta inmunitaria; por tal motivo, es importante determinar la biología de esta proteína en el parásito.

El objetivo del trabajo fue producir un anticuerpo monoclonal contra la proteína con actividad COX de *L. mexicana*.

Materiales y métodos. A partir de un cultivo de promastigotes de *L. mexicana* se obtuvo un extracto total, el cual se separó por centrifugación para obtener la fracción soluble y la fracción de membrana. La fracción soluble se utilizó para purificar la proteína con actividad COX mediante el uso de sulfato de amonio. Mediante Western blot se identificó la proteína y posteriormente se midió la actividad COX. Con la proteína purificada, se procedió a inmunizar ratones BALB/c. Se evaluó el título de anticuerpos por medio de ELISA en los ratones inmunizados y los ratones que presentaron buen título de anticuerpos se emplearon para la producción de hibridomas. El sobrenadante de los hibridomas obtenidos se probó en ensayos de Western blot e inmunofluorescencia.

Resultados. Se obtuvieron cinco clones que reconocen la proteína con actividad COX por medio de ELISA e inmunofluorescencia, en promastigotes de *L. mexicana*.

Conclusiones. Los anticuerpos monoclonales producidos pueden utilizarse para detectar a la proteína con actividad COX, en ensayos de ELISA e inmunofluorescencia.

• • •

Canales iónicos en la membrana de la vacuola parasitófora de *Leishmania amazonensis*

María Elisa Forero^{1,2}, Camilo Pérez^{1,3}, Walter Stuhmer⁵, Marcela Camacho^{1,2,4}

¹ Grupo de Biofísica y Biología de Membranas, Centro Internacional de Física, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Centro Internacional de Física, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

³ Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

⁵ Max Planck Institute for Experimental Medicine, Göttingen, Alemania

Introducción. *Leishmania* es fagocitado por macrófagos y se ubica dentro de una vacuola parasitófora, un compartimiento endolisosómico con pH ácido. En la membrana de esta vacuola se han descrito transportadores ABC sensibles

a probenecid y bombas ATPasa encargadas de la acidificación de este compartimiento. Usando *patch clamp* en configuración de vacuola adherida, nuestro grupo ha reportado la presencia de corrientes aniónicas y catiónicas.

En este trabajo hemos ampliado nuestros estudios sobre la permeabilidad de esta membrana.

Materiales y métodos. A partir de macrófagos J774A.1 infectados con *Leishmania amazonensis*, purificamos vacuolas parasitóforas por centrifugación diferencial. La viabilidad de estos compartimientos se verificó mediante marcación con amarillo lucifer y naranja de acridina. Se hicieron registros electrofisiológicos con la técnica de *patch clamp* en configuración de vacuola adherida. Se hicieron estudios de proteómica para identificar canales iónicos involucrados en extractos de macrófago, *Leishmania* y macrófagos infectados. Así mismo, se hizo marcación por inmunofluorescencia.

Resultados. En la configuración de vacuola adherida se registraron corrientes de aniónica y catiónicas en la membrana de la vacuola parasitófora. La marcación positiva con anticuerpos anti-IP3 y radianodina, indica que la membrana de la vacuola parasitófora se deriva también de retículo endoplasmático y estos canales podrían explicar las corrientes catiónicas detectadas. Se hicieron también marcaciones con anticuerpos anti-ClC, Kv1.3 y Kir 2.1.

Conclusiones. Las corrientes detectadas en la membrana de la vacuola parasitófora podrían ser producto de la expresión de canales iónicos presentes en la membrana del macrófago, del retículo endoplásmico y endosómicos.

• • •

Detección y caracterización de fosfolipasas A de *Leishmania braziliensis*

María Laura Belaunzarán, Estela María Lammel, Guadalupe Giménez, Emanuel Bott, Elvira de Isola
Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Introducción. Previamente se caracterizó la actividad de fosfolipasa A₁ de *Trypanosoma cruzi*, la cual fue significativamente mayor en estadios infecciosos, asociada a membrana y secretada. La actividad de fosfolipasa A₁ genera segundos mensajeros lipídicos en la célula huésped y participa en eventos de señalización que preceden la invasión parasitaria.

En el presente trabajo se estudian las actividades de fosfolipasa en *Leishmania braziliensis*, tripanosomátido de importancia médica.

Materiales y métodos. *Parásitos:* Promastigotes de *L. braziliensis*, clon MHOM/BR/75M2904.

Se utilizaron promastigotes de *L. braziliensis*, clon MHOM/BR/75M2904. Para evaluar la fosfolipasa secretada, se incubaron promastigotes en RPMI+5%SFB, durante una hora a 37 °C y se centrifugaron. Se filtraron alícuotas de los sobrenadantes (100.000 kDa) y se almacenaron a -80 °C con inhibidores de proteasas.

Para los homogenatos parasitarios, los parásitos se congelaron/descongelaron en N₂ líquido, con inhibidores de proteasas, se centrifugaron y se almacenaron a -80 °C.

Para los anticuerpos anti-actividad de fosfolipasa A₁, se inmunizaron ratones BalbC, por vía intramuscular con 10 µg/ml enzima/ratón. Como antígenos se empleó fosfolipasa A₁ purificada de *T. cruzi* y fosfolipasa A₁ recombinante de *T. brucei*.

Para la actividad de fosfolipasa, se incubaron alícuotas de homogenatos parasitarios y sobrenadantes de cultivo, con 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C] oleoilfosfatidilcolina, durante una hora a 37 °C. Los lípidos se extrajeron por Bligh&Dyer, se separaron por cromatografía en capa delgada y se evaluó por autorradiografía la generación de lisofosfatidilcolina (actividad actividad de fosfolipasa A₁) y ácidos grasos libres (actividad de fosfolipasa A₂).

La expresión de la fosfolipasa se determinó por inmunoblot, en homogenatos parasitarios y sobrenadantes de cultivo, utilizando anticuerpos anti-actividad de fosfolipasa A₁.

Resultados. Se determinó, en homogenatos de promastigotes de *L. braziliensis*, la generación de lisofosfatidilcolina y de ácidos grasos libres, indicativos de actividad de fosfolipasa A₁ y fosfolipasa A₂, respectivamente, sobre fosfatidilcolina. Se reconocieron por inmunoblot dos bandas de aproximadamente 40 a 50 kDa en homogenatos de promastigotes de *L. braziliensis*, empleando anticuerpos anti-actividad de fosfolipasa A₁ de *T. cruzi* y de *T. brucei*. Se evaluó, además, la secreción de fosfolipasa en sobrenadantes de cultivo de promastigotes.

Conclusiones. Se detectó por primera vez actividad de fosfolipasa A₁ en promastigotes de *L. braziliensis*. Este hallazgo podría proveer nuevos blancos terapéuticos para el diseño racional de estrategias profilácticas o quimioterapéuticas.

Financiación. CONICET/ UBA/ FONCYT

La transducción de células U-937 con el gen codificante para la proteína verde fluorescente no altera su capacidad de diferenciación ni la capacidad de infectarse.

Clemencia Ovalle¹, Carlos Franco¹, Consuelo López², Carlos Clavijo²

¹ Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, Bogotá, D.C., Colombia

² Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Las células U-937 tienen la capacidad de diferenciarse a macrófagos, lo que convierte a esta línea celular en un modelo de estudio para la leishmaniasis.

El objetivo de este trabajo fue generar una línea celular derivada de U-937 con expresión de la proteína verde fluorescente, conservando la capacidad de diferenciarse a macrófago y de ser infectada por *Leishmania braziliensis*.

Metodología. Las células U-937 fueron transducidas con un vector lentiviral codificante para la proteína verde fluorescente. Las células transducidas fueron diferenciadas a macrófagos con forbol 12-miristato 13-acetato, 100 ng/ml. Después de su diferenciación, las células se infectaron con promastigotes de *L. braziliensis* en proporción de cinco parásitos por macrófago. El porcentaje de células diferenciadas se evaluó con base en su morfología y capacidad de adherencia. El porcentaje de infección y la carga parasitaria se midieron mediante tinción de Giemsa y conteo microscópico. Se utilizaron células U-937 sin transducir como control. Los resultados de la línea transducida y la línea control para diferenciación, porcentaje de infección y carga parasitaria, se compararon mediante la prueba t de Student.

Resultados. El porcentaje de diferenciación a macrófagos fue de 49,6 % para las células transducidas y de 46,2 % para las U-937 control ($p=0,3102$). El porcentaje de infección para las U-937 transducidas fue de 33,3 % y para las del grupo control fue de 32,0 % ($p=0,8503$). La carga parasitaria fue de 6,2 parásitos por célula transducida infectada y de 5,8 parásitos por célula U-937 control ($p=0,9882$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dos líneas celulares en los parámetros evaluados.

Conclusión. La línea celular generada conserva la capacidad de diferenciación a macrófagos y de ser infectada por *L. braziliensis*.

Expresión diferencial de proteínas en *Leishmania (Viannia) panamensis* asociadas con mecanismos de resistencia a antimonio de meglumina

Ronald Guillermo Peláez¹, Carlos Enrique Muskus¹, Patricia Cuervo², Marcel Marín-Villa¹

¹ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Introducción. Recientemente se ha descrito la aparición de cepas de *Leishmania* spp. resistentes a varios medicamentos, entre ellos el antimonio pentavalente, que ha sido el tratamiento de elección por más de 50 años, por lo que es de gran interés identificar las proteínas involucradas en este mecanismo de resistencia en especies del subgénero *Viannia*, como *Leishmania (V.) panamensis*.

Objetivo. Este estudio tiene como objetivo identificar proteínas diferencialmente expresadas en una línea de *L. (V.) panamensis* sensible y resistente a antimonio de meglumina, las cuales podrían estar involucradas en mecanismos de resistencia.

Materiales. Las proteínas de la línea sensible y resistente a antimonio pentavalente, se separaron usando geles de electroforesis en dos dimensiones y las proteínas identificadas con aumento de la expresión, fueron escindidas y analizadas usando MALDI-TOF/TOF. Se cuantificaron los niveles de ARNm de cinco de estas proteínas, mediante PCR en tiempo real.

Resultados. En este estudio, en la línea resistente, se encontró aumento de la expresión de Hsp70 mitocondrial y citosólica, disulfuro isomerasa, proteasa de cisteína, enolasa, factor de elongación 5 alfa, la subunidad alfa 5 del proteasoma y dos proteínas hipotética nombradas como Sp(2) y Sp(25).

Conclusión. Este es el primer estudio realizado con una línea resistente a antimonio de meglumina en *L. (V.) panamensis*, donde se han identificado diez proteínas que posiblemente están relacionadas con el mecanismo de resistencia del parásito frente al medicamento, lo cual abre el camino para futuros estudio de estas proteínas como blancos terapéuticos.

• • •

• • •

Estudio y caracterización de la familia de las prohibitinas en *Leishmania* spp.

T. Cruz, G. González, L. M. de Pablos, A. Osuna
Instituto Biotecnología, Grupo de investigación
Bioquímica y Parasitología Molecular, Departamento
de Parasitología. Universidad de Granada, Campus
Universitario Fuentenueva, Granada, España

Introducción. La leishmaniasis es una enfermedad que, por su naturaleza zoonótica, afecta a perros y humanos, y es causada por protozoos del género *Leishmania*. Las proteínas reguladas selectivamente en las formas infecciosas del parásito pueden ser críticas en la patogénesis y, en especial, aquellas que intervienen de forma directa en los mecanismos de multiplicación y en los fenómenos de inhibición de la apoptosis.

Las prohibitinas 1 y 2 son pequeñas proteínas conservadas implicadas en numerosas funciones en la mitocondria, así como en el núcleo de células eucariotas; entre ellas, la más destacada es su papel en la apoptosis celular, encontrándose expresadas en forma exagerada en las células tumorales.

Materiales y métodos. Dichas proteínas han sido clonadas sobre el vector de expresión pQE y se

han obtenido como recombinantes en *E. coli* M15 y SG13009, recombinantes denominados Phb1R y Phb2R. Dichos recombinantes se usaron para obtener inmunoseros, para su posterior uso en inmunolocalización. Se usó la técnica de PCR en tiempo real para valorar su expresión en los diferentes estadios y cepas.

Resultados y conclusión. Las prohibitinas de *Leishmania* comparten entre un 95 y 100 % de similitud en cuanto a su secuencia genética dentro del género y 41 % con las de mamíferos. La cuantificación de los genes *phb1* y *phb2* demuestran que los niveles de expresión varía según el estadio del parásito con respecto al gen de referencia y con niveles semejantes en diferentes especies de *Leishmania*, excepto en la *phb2*. Se localizan en el polo flagelar, en la superficie del flagelo, así como en la mitocondria. Debido a que la mitocondria es el centro de la homeostasis del hierro, se decidió estudiar la posibilidad de que las prohibitinas fueran proteínas ligadoras de hierro, lo cual se confirmó, y se sugirió que las prohibitinas podrían jugar un papel en la regulación intracelular de dicho catión.

• • •